

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2005年10月13日 (13.10.2005)

PCT

(10)国際公開番号
WO 2005/095968 A1

(51)国際特許分類⁷:

G01N 33/544, 33/576

(74)代理人: 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町MTビル19階 Tokyo (JP).

(21)国際出願番号:

PCT/JP2005/005803

(22)国際出願日:

2005年3月29日 (29.03.2005)

(81)指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25)国際出願の言語:

日本語

(26)国際公開の言語:

日本語

(30)優先権データ:

特願2004-104702 2004年3月31日 (31.03.2004) JP

(84)指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。



A1

(54) Title: SENSING TOOL

(54)発明の名称: センシングツール

(57)Abstract: A substance sensing tool using hollow nanoparticles characterized in that a specified substance recognizing molecule is introduced in a protein capable of incorporating a lipid bilayer to thereby form nanosized particles. Further, there is provided a relevant sensing method.

(57)要約: 本発明は、脂質2重膜を取り込んでナノサイズの粒子を形成する能力を有するタンパク質に特定の物質認識分子が導入されていることを特徴とする中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツール、およびセンシング方法に関する。

WO 2005/095968

明 細 書

センシングツール

技術分野

[0001] 本出願の発明は、脂質膜と「粒子を形成する能力を有するタンパク質」を含み、中空構造であることを特徴とする、直径がナノサイズの粒子を用いた物質のセンシングツール、およびセンシング方法に関するものである。

背景技術

[0002] 近年、特定の分子を標識またはその分子だけが持つ特異的な活性を利用し、その分子を他と区別して選択的にセンシングする研究が盛んに行われている。特に、生体内や環境中に極微量に存在するタンパク質や核酸あるいは化合物等を特異的かつ高感度にセンシングすることは疾患の早期診断や環境ホルモンの計測など医学や環境、食品検査、生命科学分野などにおいて切実に要求されており、物質の特異的標識方法や測定感度向上のための研究が盛んに行われている。

[0003] 微量物質の高感度センシング方法としては、大別すると、目的とする物質を蛍光や発光などで標識してセンシングする方法、あるいは物質との結合を高感度に感知する表面プラズモン共鳴法(SPR:Surface Plasmon Resonance)や水晶振動子法(QCM:Quartz Crystal Microbalance)等によるセンシング方法があり、これらの手法を用いることでngからpg単位の物質のセンシングが可能となる。蛍光や発光などの標識によるセンシング法は、検出したい物質を蛍光または発光などの強い信号を発する物質(例えば、緑色発光タンパク質であるgreen fluorescent proteinや発光酵素であるluciferase等)で特異的に標識し、その標識物質をセンシングすることで感度を向上させる方法である(非特許文献1参照)。近年、この手法によるセンシングの高感度化を図るため、ナノサイズの粒子を応用した研究が盛んに行われている。例えば、脂質からなる直径200～500nmのリポソームの中に標識物質(特に、HRPなどの酵素)を内包させ、架橋剤などによってリポソーム表面に抗体などの物質認識分子を共有結合させる方法(特許文献1)や「量子ドット」と呼ばれる直径10～15nmの蛍光粒子体の表面に抗体やビオチン、またはストレプトアビジンタグなどを固定し、

蛍光によって検出する方法(特許文献2、非特許文献2)が考案されている。他にも、ポリマーからなる微粒子による方法や、微生物が産生する直径100nm前後の磁性粒子の表面に何らかの方法で2次抗体を固定し、粒子が持つ磁性を検出の標識物質として検出しようとする方法(非特許文献3)や金コロイドを用いる方法(非特許文献4)などが考案されている。また、測定の迅速かつ簡便化についてはSBA(Suspension Beads Array)法を利用し、最大100種の抗原を同時に測定可能な自動システムが開発されている(非特許文献5)。SPRは金属(誘導体)界面に局在しながら界面に沿って伝搬する電磁波である表面プラズモンを利用し、物質が結合したときの金属表面での電荷密度波の変化を測定することで物質の結合力や量を測定する方法である(非特許文献6、7参照)。QCMは電極上に吸着した質量に比例して基本振動数が減少することを利用し、ナノグラムレベルで物質の結合量や結合と解離の速度が測定できる方法である(非特許文献7、8参照)。

[0004] 加えて、タンパク質等を細胞の表面に提示させることで、物質のセンシングに応用する研究も行われている。具体的には、酵母などの生細胞やウイルスの表面に機能を持つタンパク質やペプチドなどを提示させる手法(非特許文献9－11、特許文献3、4参照)が試みられている。

非特許文献1:大島ら 著、ポストシーケンスタンパク質実験法2、東京化学同人、2002年、p130－146

非特許文献2:Ozkan, M., Drug Discovery Today、2004年、第9巻、p1065－1071

非特許文献3:田中 剛・松永 是 著、日本応用磁気学会誌、2004年、第28巻、p675－679

非特許文献4:Penn, S. et al. , Current Opinion in Chemical Biology、2003年、第7巻、p609－615

非特許文献5:Nolan, J. , Mandy, F. , Cell and Molecular Biology、2001年、第47巻、p1241－1256

非特許文献6:岡本隆之・山口一郎 著、表面プラズモン共鳴とそのレーザー顕微鏡への応用、レーザー研究、レーザー学会、1996年、24巻、10号、p1051－1053

非特許文献7:大島ら 著、ポストシーケンスタンパク質実験法3、東京化学同人、2002年、p115—137

非特許文献8:岡畑恵雄・古沢宏幸 著、先端化学シリーズIII、丸善株式会社、2003年、p67—73

非特許文献9:Szardenings M, J., Recept Signal Transduct Res., 2003年、23、p307—49

非特許文献10:植田充美、バイオサイエンスとインダストリー、(財)バイオインダストリー協会、1997年、55、p253—254

非特許文献11:植田充美・村井稔幸、生物工学、日本生物工学会、1998年、76、p506—510

特許文献1:特開2003—149246号公報

特許文献2:米国特許6274323号

特許文献3:特開2001—316298号公報

特許文献4:特表2003—504506号公報

発明の開示

[0005] 生体内や環境中にはpg以下の超微量で存在しながらも非常に重要な生理活性を持つ分子が数多く存在する。これらの超微量に存在する分子は上記に代表されるセンシング方法だけでは測定が困難であるため、濃縮や精製等によるセンシング信号の増幅工程が必要とされる。しかし、これらの工程は煩雑であり、更に濃縮・精製における装置への非特異的な吸着などによるサンプルの損失やサンプル中に大量に存在する分子によるマスキング効果などにより、特に目的とする物質のサンプル中の含有量が微量であるほどそのセンシングは困難となる。従って、生体内や環境中に超微量に存在する分子のセンシングを可能とするために、センシング信号を増幅できる方法の確立が待たれている。加えて、この増幅技術が従来のセンシング技術(量子ドット、SPR、QCM等)と容易に併用可能であればなお望ましく、それにより従来のセンシング法の感度向上につながる。また、センシング信号の増幅技術は、DNAチップやプロテインチップに代表されるバイオチップのように、微量のサンプルを用いて定量的かつ高感度なセンシングが求められる場合に必要不可欠な技術として求め

られている。

- [0006] このような物質のセンシング感度向上の課題を解決する有効な方法として、センシングが容易な構造体の表面に、目的の物質を特異的に感知する物質認識分子を結合し、目的分子と結合した該構造体をセンシングすることでセンシングの信号を増幅させることが考えられる。センシングが容易な構造体としては、量子ドット、リポソーム、ポリマー、磁性粒子、金コロイドなどの粒子体や酵母などの生細胞、ウイルス等が考えられる。
- [0007] しかし、量子ドットは標識物質が蛍光のみに限られることから、物質認識分子として抗体を用いる免疫学的検出法などにおいてもっとも一般的なHRP(Horse Radish Peroxidase)やAP(Alkaline Phospatase)などの酵素を標識物質して使えないという汎用性の問題がある。そのため、量子ドットの蛍光を検出するための高価な検出装置が必要とされる。更に量子ドット自体が非常に高価であるといった問題もある。また、リポソームを利用した手法は、蛍光より感度が高いHRPやAPなどの酵素を使うことができるが、これらを粒子に内包させなければならず、そのため、高温やボールテクス、超音波といったタンパク質が変性しやすい過酷な処理を行う必要がある。また、この方法は標識物質となる酵素を別途合成・精製し、添加しなければならないため、量子ドット同様、生産コストが高い。更に、リポソームは物理的な安定性が低いといった問題もある。また、磁性粒子や金コロイドは標識方法が限定されている上に検出感度が充分ではない。また、ポリマーや金属からなる微粒子には自家蛍光を発する材料が多く、光学検出器を使った蛍光や発光等のセンシングにおいて高いバックグラウンドを生じやすい点からも、材料選択において制限が多い。このように、現存する検出信号増幅技術(センシング技術)は、感度、汎用性、生産コスト、高価な検出装置の必要性など、その実用化を妨げる様々な課題を持っている。
- [0008] これらの課題に加えて、現存する検出信号増幅技術に共通する大きな課題として、粒子に抗体などの物質認識分子を結合する際、物質認識分子の向きを揃えた状態で粒子表面に結合させることは非常に困難であるため、ランダムな向きで粒子に結合された物質認識分子による非特異的結合の増加が挙げられる。このような非特異的結合の増加は、検出の精度を低下させる原因となる。特に、サンプル中のターゲット

物質の濃度が微量であるほど非特異的結合は大きな問題となっている。このような非特異的結合を防ぐには、目的物質と結合する反応部位以外を脂質などで被覆することが考えられる。例えば、人工的、または生物由来の脂質膜からなる粒子を使うことで回避できると考えられるが、人工的な脂質粒子(リポソーム)は前述の問題点に加え、物質認識分子の提示量が少ない、また、物質認識分子の整列化が困難などの問題がある。

- [0009] 更に、これらの現存する検出信号增幅技術に共通するもう一つの課題は、粒子と標識物質と物質認識分子を別々に調製し、架橋結合などで人工的に結合させなければならぬことである。そのため、品質の管理が難しく、製造バッチごとの品質のばらつきなど生産性における懸念がある。また、これらの現存する検出信号增幅技術に用いられる粒子の生産には有機溶媒などを用いることが多く、環境に対する影響も懸念される。このように、現存する検出信号增幅技術は、検出の特異性や精度、生産性、環境安全性などの問題もある。
- [0010] また、生細胞やウイルスは、遺伝子工学的手法などを用いて膜表面に物質認識分子を整列化させて提示できる反面(Microbiology and Molecular Biology Reviews、1171–1190、1998参照)その利用に際して感染や環境への影響等、安全性の面から制限が多い。加えて、生細胞を用いる場合は内在性の酵素や化合物により、バックグラウンドの増加やセンシング反応の阻害などが起こりうる。また、目的以外の物質が表面(特に細胞壁)の構造に非特異的に結合し、高いバックグラウンドを生じやすい。
- [0011] 特開2001–316298号公報に記載されているように、「粒子を形成する能力を有するタンパク質」が細胞内で自己組織化によって細胞内の脂質2重膜を取り込みながらナノサイズの中空ナノ粒子を形成することが知られており、該中空ナノ粒子の表面には自己組織化した「粒子を形成する能力を有するタンパク質」が高密度に整列している。
- [0012] しかし、現在までに該粒子を用いたセンシングの信号・感度増幅のための応用例はなく、該粒子を検出することでウイルス感染の有無を特定する、あるいは臓器特異的に薬物を輸送するためのDDS研究などに使われているのみである。

- [0013] そこで、この出願の発明は、かかる現状を鑑みてなされたものであり、従来技術の問題点を解消し、目的とする物質(遺伝子、タンパク質、化合物等)を高精度、かつ高感度にセンシングできる汎用的なツールおよびこれらを用いたセンシング方法を提供することを課題としている。
- [0014] 本発明者らは、鋭意検討をした結果、該中空ナノ粒子を用いることで現存する高感度センシング技術に関する上記課題を全て解決できることを見いだし本発明に至った。
- [0015] すなわち、この「粒子を形成する能力を有するタンパク質」は遺伝子工学的手法などで改変・修飾を施すことで粒子の表面に抗体などの物質認識分子や標識物質を高密度に結合・整列できるため、該粒子の検出感度が劇的に向上する。
- [0016] 更に、本発明の中空ナノ粒子の最も重要な特徴として、その構成が自己組織化した「粒子を形成する能力を有するタンパク質」の周りを脂質2重膜が囲んでおり、目的物質と結合する反応部位以外が脂質で被覆されていることから非特異的結合が起こりにくいことが挙げられるため、検出の特異性と精度が劇的に向上する。
- [0017] 更に、多種の物質認識分子が粒子表面に結合可能であることに加えて、粒子の標識物質として蛍光体、酵素、放射線同位元素などが利用できるため汎用性が広い。更に、細胞から本中空ナノ粒子を生産する際、抗体などの物質認識分子や標識物質である酵素などを遺伝子工学的手法で同時に生産することが可能な上、クローン化することで均一な品質の中空ナノ粒子を常に生産可能であり、またハンドリングしやすい酵母などを本粒子の生産系として利用できるため、生産性や生産コストの面で優れている。更に、標識物質として酵素などを利用できることから高価な検出装置を必ずしも必要としない。更に、本粒子は細胞から生産されるため、その生産において有機溶媒などを使う必要がない上、タンパク質と脂質からなる生分解性の粒子であるため、環境安全性に優れる。更に、生きた細胞やウイルスを使わない点から感染等の危険性がなく、内在性の酵素や化合物による検出阻害やバックグラウンドの問題も回避できる。他にも、自家蛍光がないこと、粒子は物理的にも非常に安定で、熱や界面活性剤、あるいは8Mのウレア存在下などでもその形態を維持できることなどの特徴をもつ。

- [0018] この出願の発明は、上記の課題を解決するため、まず第1に、脂質2重膜を取り込んでナノサイズの「粒子を形成する能力を有するタンパク質」に物質認識分子が結合したセンシングツールを提供する。
- [0019] 第2に、この出願の発明は、タンパク質がウイルスの表面抗原タンパク質である前記第1に記載のセンシングツールを提供する。
- [0020] 第3に、この出願の発明は、蛍光分子、発光分子、吸光分子、または放射線同位元素を持つ分子からなる群より選択された1種以上の分子を中空ナノ粒子の脂質2重膜、粒子を形成する能力を有するタンパク質、または物質認識分子に結合させるか、あるいは中空ナノ粒子に内包させた前記第1ないし第2に記載のセンシングツールを提供する。
- [0021] 第4に、この出願の発明は、前記第1ないし第3の中空ナノ粒子が基板上に並ぶことで形成された平面膜状生体認識分子整列体を用いた物質のセンシングツールを提供する。
- [0022] 第5に、この出願の発明は、前記第1ないし第4のいずれかのセンシングツールを用いる物質のセンシング方法を提供する。
- [0023] この発明によって、物質認識分子を提示した中空ナノ粒子を利用した、生体または環境中の極微量成分を効率的にセンシングするための汎用的なツールおよびこれらを用いたセンシング方法が提供される。このツールおよび方法は、「粒子を形成する能力を有するタンパク質」に遺伝子工学的手法などで改変・修飾を施すことで粒子の表面に抗体などの物質認識分子や標識物質を高密度に結合・整列できるため、該粒子の検出感度が劇的に向上する。
- [0024] 更に、本発明の中空ナノ粒子の最も重要な特徴として、その構成が自己組織化した「粒子を形成する能力を有するタンパク質」の周りを脂質2重膜が囲んでおり、目的物質と結合する反応部位以外が脂質で被覆されていることから非特異的結合が起こりにくいことが挙げられるため、検出の特異性と精度が劇的に向上する。
- [0025] 更に、多種の物質認識分子が粒子表面に結合可能であることに加えて、粒子の標識物質として蛍光体、酵素、放射線同位元素などが利用できるため汎用性が広い。更に、細胞から本中空ナノ粒子を生産する際、抗体などの物質認識分子や標識物

質である酵素などを遺伝子工学的手法で同時に生産することが可能な上、クローン化することで均一な品質の中空ナノ粒子を常に生産可能であり、またハンドリングしやすい酵母などを本粒子の生産系として利用できるため、生産性や生産コストの面で優れている。更に、標識物質として酵素などを利用できることから高価な検出装置を必ずしも必要としない。更に、本粒子は細胞から生産されるため、その生産に於いて有機溶媒などを使う必要がない上、タンパク質と脂質からなる生分解性の粒子であるため、環境安全性に優れる。更に、生きた細胞やウイルスを使わない点から感染等の危険性がなく、内在性の酵素や化合物による検出阻害やバックグラウンドの問題も回避できる。更に、自家蛍光もないこと、物理的に非常に安定であること等の特徴をもつ。しかも、このツールおよび方法はSPR、QCM、量子ドット等の現存の物質測定技術にそのまま応用できることなどから、産業上の利用性も高い。

図面の簡単な説明

- [0026] [図1]図1は、この発明の実施例におけるHBsAg遺伝子の各タンパク質領域を表す概略模式図である。1～8は、表面抗原における各部位の働きを示している。
- [図2]図2は、この発明の実施例における遺伝子組換え酵母を用いたHBsAg粒子の発現および精製操作を例示した概略説明図である。(a) 遺伝子組換え酵母の作成、(b) High-Pi培地における培養、(c) 8S5N-P400培地における培養、(d) 破碎、(e) 密度勾配遠心分離、(f) HBsAg粒子。
- [図3]図3は、この発明の実施例におけるHBsAg粒子によるSPR信号増幅効果を表す。X軸は反応時間(sec)をY軸は信号の大きさを表す。
- [図4]図4は、この発明の実施例におけるpGLDLIIP39-RcT GFPの概略模式図である。制限酵素NotI部位へのHis6-GFP挿入部以外は図1に準ずる。
- [図5]図5は、この発明の実施例におけるGFP融合粒子のセンシング信号増幅効果をSPRで測定した結果を表す図である。X軸は反応時間(sec)をY軸は信号の大きさを表す。
- [図6]図6は、この発明の実施例におけるGFP融合粒子による平面膜状生体認識分子整列体の非特異的結合抑制効果と物質認識分子の整列効果を表す図である。X軸は反応時間(sec)をY軸は信号の大きさを表す。

図中の符号の説明

- [0027] 1 放出抑制
- 2 レセプター
- 3 糖鎖1
- 4 血清重合アルブミンレセプター
- 5 膜貫通
- 6 安定化
- 7 糖鎖2
- 8 膜貫通 低重合化・分泌

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願2004-104702号の明細書に記載された内容を包含する。

発明を実施するための最良の形態

- [0028] 本発明は、脂質2重膜を取り込んでナノサイズの粒子を形成する能力を有するタンパク質に物質認識分子が結合したセンシングツールである。
- [0029] 本発明は、好ましくは、結合が共有結合であるセンシングツールである。
- [0030] 本発明は、好ましくは、ナノサイズの粒子が中空ナノ粒子であるセンシングツールである。
- [0031] 本発明は、好ましくは、タンパク質がウイルスの表面抗原タンパク質であるセンシングツールである。
- [0032] 本発明は、好ましくは、タンパク質がB型肝炎ウイルスの表面抗原タンパク質であるセンシングツールである。
- [0033] 本発明は、好ましくは、タンパク質が真核細胞由来の脂質2重膜を取り込んでナノサイズの粒子を形成する能力を有するタンパク質であるセンシングツールである。
- [0034] 本発明は、好ましくは、タンパク質が酵母由来の脂質2重膜を取り込んでナノサイズの粒子を形成する能力を有するタンパク質であるセンシングツールである。
- [0035] 本発明は、好ましくは、タンパク質が動物または昆虫細胞由来の脂質2重膜を取り込んでナノサイズの粒子を形成する能力を有するタンパク質であるセンシングツールである。

- [0036] 本発明は、好ましくは、物質認識分子が細胞機能調節分子であるセンシングツールである。
- [0037] 本発明は、好ましくは、物質認識分子が抗原、または抗体、または抗体の一部、または抗体類似体であるセンシングツールである。
- [0038] 本発明は、好ましくは、物質認識分子がリガンド物質と結合する細胞表面あるいは細胞内のレセプタータンパク質、またはその変異体、またはその一部、またはそれに結合する物質であるセンシングツールである。
- [0039] 本発明は、好ましくは、物質認識分子が酵素、またはその変異体、またはその一部、またはそれに結合する物質であるセンシングツールである。
- [0040] 本発明は、好ましくは、蛍光分子、発光分子、吸光分子および放射線同位元素を持つ分子からなる群より1種以上選択された分子を物質認識分子に結合させたセンシングツールである。
- [0041] 本発明は、好ましくは、蛍光分子、発光分子、吸光分子および放射線同位元素を持つ分子からなる群より1種以上選択された分子を粒子を形成する能力を有するタンパク質に結合させたセンシングツールである。
- [0042] 本発明は、好ましくは、蛍光分子、発光分子、吸光分子および放射線同位元素を持つ分子からなる群より1種以上選択された分子を脂質2重膜に結合させたセンシングツールである。
- [0043] 本発明は、好ましくは、蛍光分子、発光分子、吸光分子および放射線同位元素を持つ分子からなる群より1種以上選択された分子を中空ナノ粒子に内包させたセンシングツールである。
- [0044] 本発明は、好ましくは、ナノサイズの粒子が基板上に並ぶことで形成される平面膜状生体認識分子整列体を用いるセンシングツールである。
- [0045] 本発明は、脂質2重膜を取り込んでナノサイズの粒子を形成する能力を有するタンパク質に物質認識分子が結合したセンシングツールを用いる物質のセンシング方法である。
- [0046] 本発明において「脂質2重膜」とは、5～20nmの厚さで2枚の脂質の層からなっており、それぞれの層の中で、両親媒性脂質の極性の頭が親水系の溶媒と接触してお

り、非極性の炭化水素の部分が2重層の内部を向いているものをいう。脂質2重膜の例としては、細胞膜や核膜、小胞体膜、ゴルジ体膜、液胞膜のような生細胞における生体膜、または人工的に作製したリポソーム等が挙げられる。中でも小胞体膜由来の脂質2重膜がより好ましい。脂質2重膜としては、真核生物、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞、昆虫細胞など由来のものが好ましく、特に好ましくは酵母由来の脂質2重膜が用いられる。

- [0047] 本発明において「認識する」とは、ある2つ以上の物質がお互いの構造あるいは性質によって特異的に結合することを意味する。この結合は共有結合、イオン結合、疎水結合、水素結合、金属結合等のあらゆる分子間相互作用によって成し遂げられ、例え認識される相手の物質が夾雑物の中であっても特異的に行われるものである。
- [0048] 本発明において「粒子を形成する能力を有するタンパク質に物質認識分子が結合されている」形態に特に制限はないが、好ましくは物質認識分子が遺伝子工学的手法により、「粒子を形成する能力を有するタンパク質」に共有結合により融合(ペプチド結合)されている、つまり物質認識分子と「粒子を形成する能力を有するタンパク質」が融合タンパク質として細胞の中で発現された状態で粒子を形成していることを示すか、または物質認識分子が「粒子を形成する能力を有するタンパク質」に物理的、あるいは化学的な修飾や吸着等の方法で結合されていることをいう。ここでいう「物理的、あるいは化学的」な修飾や吸着とは、例えば、イオン結合、疎水結合、水素結合、金属結合、あるいはジスルフィド結合などの共有結合等、あるいはこれらの組み合わせによる修飾や吸着のことである。
- [0049] もちろん、複数の物質認識分子が「粒子を形成する能力を有するタンパク質」に結合されていても良い。また、複数の物質認識分子が組み合わさって一つの物質認識分子を形成していても良い。この際、物質認識分子同士の結合様式には特に制限がなく、共有結合、イオン結合、疎水結合、水素結合、金属結合等、あるいはこれらの組み合わせにより成し遂げられるものであればよい。
- [0050] 本発明において「中空ナノ粒子」とは、ナノサイズの粒子、好ましくは20～500nm、更に好ましくは50～200nm、更に好ましくは80～150nmの直径を持つ粒子であり、粒子の内部には様々な物質(例えば、蛍光色素やタンパク質、核酸、化合物等)が

入れられる空間がある粒子をいう。その空間は必ずしも気体系の空間ではなく、むしろ内部に入る物質が安定に維持できる溶液系の空間である。

- [0051] 本発明において「リガンド物質」とは、ホルモン(生物個体中のある部位の細胞が、別の部位の細胞と連絡するための分子)や増殖因子(細胞増殖を制御する物質)、神経伝達物質(シナプスで神経情報を伝達する物質)のように対応するレセプターと結合して、細胞内または細胞間の情報伝達に関わる物質を意味し、ペプチドやタンパク質あるいはステロイド性、または低分子化合物からなる。
- [0052] 本発明において「細胞表面」とは、細胞壁または細胞膜の中、あるいはその表面を意味する。これらのリガンド物質は生細胞から精製する方法、遺伝子組み替えによってリガンド物質を発現するプラスミドを作製し、大腸菌や酵母、昆虫、動物、植物等の細胞、または細胞を用いない無細胞タンパク質合成系を用いて生産し、精製する方法や化学合成によって得られる。
- [0053] 本発明において「細胞内」とは、細胞膜によって包まれている全ての部分を意味する。また「レセプタータンパク質」とは、リガンド物質と結合し、細胞内または細胞間の情報伝達に関わる一連のタンパク質群を意味し、その例としては、例えば、グアニヌクレオチド結合タンパク質や核内受容体の様に細胞膜や細胞内に存在しながらホルモン等のリガンド物質と結合して、その信号を細胞外から細胞内へ、あるいは細胞質から核に伝えるタンパク質群やリガンド物質として増殖因子が結合する、レセプターチロシンキナーゼ、またはアドレナリン受容体のような神経伝達物質を認識してその信号を伝えるタンパク質群等がある。
- [0054] 本発明において「レセプタータンパク質」は、上記以外にも細胞の各膜内に存在しながら金属イオン等の能動輸送に関わるタンパク質群も含む。これらの「レセプタータンパク質」は生細胞から精製する方法、遺伝子組み替えによってリガンド物質を発現するプラスミドを作製し、大腸菌や酵母、昆虫、動物、植物等の細胞、または細胞を用いない無細胞タンパク質合成系を用いて生産し、精製する方法や化学合成によって得られる。本発明において「レセプタータンパク質」は必ずしも全長である必要はなく、リガンドと特異的に結合する能力を有している限りにおいて、アミノ酸置換・欠損・付加などを伴う変異体やレセプタータンパク質の一部であっても良い。

- [0055] 本発明において「酵素」とは、細胞の内外で核酸や糖、脂質、あるいは他のタンパク質を修飾、切断、融合、変性、結合させることで細胞の生命現象を司る一連のタンパク質群であり、例えば、プロテアーゼやリン酸・糖鎖修飾酵素、核酸切断(制限)酵素、糖・脂質分解酵素、核酸・タンパク質・糖・脂質の生合成酵素等が挙げられ、またそれ自体では活性がないが、他の酵素の活性を助ける補酵素もその意の中に入る。
- [0056] 本発明においてレセプタータンパク質または酵素の「変異体」とは、これらタンパク質に遺伝子工学的に点、あるいは複数のアミノ酸置換を起こしたもの、またはタンパク質の全長から一部を削り取るか、新しくタンパク質配列を付け加えたもの、更には核酸・糖・脂質・化合物等によってタンパク質の一部に修飾を施したものであって変異を起こす前のレセプタータンパク質や酵素が物質認識分子として認識する目的分子と同一のものを認識する活性を持つものまでを含む。このような変異体を作製するには該タンパク質を発現する遺伝子を含む環状プラスミド上でアミノ酸の欠失、置換若しくは付加を行うためのプライマーとQuikChange site-directed mutagenesis kit、またはQuikChange multi site-directed mutagenesis kit、またはQuikChange XL site-directed mutagenesis kit(STRATAGENE社)等の変異を起こすためのキットを用いて12～18サイクルのPCRを行い、その産物を制限酵素DpnIで切断し、大腸菌に形質転換することにより可能である。また、核酸・糖・脂質・化合物等によってタンパク質の一部に修飾を施したものとして具体的にはリン酸化酵素によるタンパク質中のセリン、またはスレオニン残基のリン酸化、糖鎖付加酵素によるアスパラギン、またはセリン、またはスレオニン残基の糖鎖付加、または還元・アルキル試薬によるシステイン残基の還元・アルキル化のようなものを例示することができ、これらのものを作製するにはタンパク質にリン酸、または糖鎖等を混ぜて、リン酸化酵素や糖鎖付加酵素を加え、その酵素が働く最適な条件(温度、pH、塩濃度等)を維持したり、タンパク質の入った溶液に還元剤であるジチオツレイトールやメルカットエタノール等を終濃度で5mM濃度になるように入れ、温度60℃付近、pH中性以上で1時間反応させ、更にアルキル化剤として5～15mM濃度のヨードアセトアミドを加え室温で1時間以上反応させることにより可能である。もちろん例示した上記の修飾以外にもタンパク質に対する様々な修飾が考えられることは言うまでもない。

- [0057] また、本発明においてレセプタタンパク質または酵素の「一部」とは、これらタンパク質が持つ特性を完全に、あるいは部分的に有する一部分の配列(少なくとも5個以上のアミノ酸が連続して一致する配列)を遺伝子工学的、あるいはタンパク工学的に取り出すか、合成したものであってレセプタタンパク質や酵素全体が認識する目的物質と同一のものを認識できる活性を有するものを意味する。
- [0058] また、本発明においてレセプタタンパク質や酵素に「結合する物質」とは、レセプタタンパク質に対するリガンド物質、あるいは酵素に対する基質や阻害剤のようにレセプタタンパク質や酵素の活性部位に特異的に結合する物質を指す。または、細胞内でこれらのタンパク質と常に結合して存在するか、あるいは結合することで、その構造を維持する、またはその活性を助けるか補う役割をする物質のことを指し、例えば、核内受容体における分子シャペロンタンパク質や酵素の活性を助ける金属イオンなどの補酵素、あるいはレセプターや酵素の細胞内の特定場所への正しい運搬や膜結合型レセプタタンパク質・酵素の膜への固定の役割を担う一連の膜タンパク質群等がこれに当てはまる。
- [0059] 本発明において「蛍光、または発光、または吸光、または放射線同位元素を持つタンパク質、またはタンパク質誘導体」とは、緑色蛍光タンパク質やその変異体のようにタンパク質そのものがある波長の光を受けて蛍光を発するものや化学修飾法を使って蛍光を発する化合物を結合させた状態のタンパク質、またはluciferase、HRP、APのように基質を発光させる活性を持つタンパク質やそのようなタンパク質が結合しているタンパク質、またはヘムタンパク質のように特定の波長に対して強い吸収を有するタンパク質や、光吸収能を持つ化合物を結合させたタンパク質、あるいは光吸収能を持つペプチドやタンパク質を結合させたタンパク質、またはガラクトシダーゼやHRP、APのように基質を発色させることができるタンパク質やそのようなタンパク質が結合しているタンパク質、または放射線同位元素であるH3やC14、N15、P32、S35、Co57、Se75、I125等をタンパク質発現時の培地に加えるか、化学修飾によって標識したタンパク質のことである。また、これらタンパク質の誘導体として、タンパク質の一部分を遺伝子工学的手法やタンパク工学的手法を用いて切り取って、他の分子、つまり核酸や糖鎖、脂質、他のタンパク質、または化合物と共有結合させたものを指

し、また、タンパク質に化学修飾法や酵素等を使って、化合物を共有結合させたもの、糖鎖や核酸、脂質等を修飾したものも含む。この際、蛍光、発光、吸光、または放射線同位元素はタンパク質本体ではなく、タンパク質誘導体としてタンパク質に結合している核酸、糖鎖、脂質等に標識された状態でも良い。

- [0060] 本発明において蛍光を持つ「化合物」とは、特定波長の光を吸収し、吸収した波長とは異なる波長範囲において蛍光を発する物質を示し、例えば、フルオレセイン、ローダミン、ダンシル、ルシファーイエローVS、ウンベリフェリル、希土キレート、Cy2、Cy3、Cy5、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ALEXA(登録商標)(Molecular Probe社)、量子ドット等が挙げられる。本発明において「基板」とは金属、プラスチック、有機・無機高分子材料であれば特に限定されないが、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリメチルペンテン、ポリメタクリル酸メチル(PMM A)、ポリカーボネート(PC)、ポリスルホン、ポリテトラフルオロテフロン(PVDF)、セルロース、シリコン、マイカー、ポリメチルペンテン(PMPまたはTPX(登録商標))、ポリスチレン(PSt)、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、ABS樹脂、ポリジメチルシリコン(PDMS)等の樹脂、それらの高分子化合物を含む共重合体あるいは複合体、石英ガラス、パイレックス(登録商標)ガラス、ソーダガラス、ホウ酸ガラス、ケイ酸ガラス、ホウケイ酸ガラス等のガラス類およびその複合体、金、銀、銅、ニッケル、コバルト等の金属およびその複合体、セラミックスおよびその複合体等が好ましく用いられる。また、その表面の全体、または少なくともセンシングが行われる部分がこれらによって覆われているものが好ましい。もちろん、これらの基板材料を複数組み合わせて用いることもできる。例えば、ガラス基板を金属で被覆した組み合わせや樹脂基板の表面を金属で被覆した基板などが好ましく用いられる。また、本発明の「基板」はセンシングを容易にするため、表面を親水性ポリマー(例えば、ポリエチレングリコールやポリビニルアルコールなど)によりコーティングやグラフトなどの処理を行ったものや疎水化したもの、ラジカル化したもの、これら基板を抗体などのタンパク質やDNAなどの核酸または糖などで被覆、修飾、処理した状態のものも含む。
- [0061] 本発明において「平面膜状生体認識分子整列体」とは、本発明が定義している中空ナノ粒子を基板に結合させ、基板を粒子で覆った状態のものを意味しており、その

作製は基板の表面に中空ナノ粒子を物理的に吸着させる方法や基板に前もって本中空ナノ粒子が特異的に結合するタンパク質やペプチド、核酸、糖鎖、脂質、金属等で修飾を施すことで中空ナノ粒子表面のタンパク質や脂質または糖鎖等と基板が特異的に結合できるようにした方法などが考えられる。本発明の「平面膜状生体認識分子整列体」において、中空ナノ粒子は目的に応じて、粒子状のまま基板に結合させるか、あるいは粒子を基板と結合させた後に乾燥や超音波処理、電気ショック等の方法で粒子を破壊し、平膜状の膜にして基板に結合させることができ、従って、「平面膜状生体認識分子整列体」の厚さは5nm～500nmのものである。本発明において「平面膜状生体認識分子整列体」の特徴としては、本発明の粒子が「粒子を形成する能力を有するタンパク質」の自己組織化によって形成されており、従って粒子によって作られる「平面膜状生体認識分子整列体」の表面には「粒子を形成する能力を有するタンパク質」に結合された物質認識分子が高密度で規則正しく整列されており、センシングの精度・感度において適していることが挙げられる。しかも本「平面膜状生体認識分子整列体」の表面は「粒子を形成する能力を有するタンパク質」以外の部分が脂質2重膜からなっており、反応に関与しない夾雜物の非特異的結合が起こりにくい特徴をも兼ね備えている。

[0062] この出願の発明の、脂質とタンパク質を含みかつ中空構造をもつナノ粒子を含む微量物質のセンシングツールおよびそれを用いたセンシング方法は、粒子を形成する能力を有するタンパク質に物質認識分子を結合することによって、そのセンシング信号を著しく増幅させ、かつ目的とする種々の分子を特異的に認識するもので、それによつて今までセンシングが困難または不可能であった生体または環境中の微量成分をもセンシング可能にするものである。

[0063] ここで「センシングツール」とは、基板上に目的物質を固定させ、それを認識する物質認識分子を含む結合した該中空ナノ粒子を結合させる蛍光、発光、吸光、放射線強度などの変化を検出するか、または目的物質を含む溶液中にそれを認識する物質認識分子を結合した該中空ナノ粒子を加えることにより濁度、蛍光、発光、吸光などの変化を検出するための手段である。また基板上に該粒子を「平面膜状生体認識分子整列体」として固定させ、目的物質を結合させる、または、溶液中、あるいは基

板上に該粒子を固定した状態で、目的物質を結合させた後、更に目的物質を認識する別の物質認識分子を含む該粒子を反応させる、サンドイッチ方式によって目的物質をセンシングする手段も本発明の「センシングツール」である。また、センシングの感度を更に増幅させるための様々な改変を施したものも本発明の「センシングツール」に含まれる。例えば、基板上に固定させた目的物質をその目的物質を認識する抗体で処理し、その抗体を特異的に認識する別の抗体が表面に結合されており、かつ、蛍光、または発光、または吸光、または放射線同位元素をその表面に提示、あるいは内包する中空ナノ粒子を用いることも改変の一つである。本発明に係る物質のセンシングツールにおける中空ナノ粒子は図1に例示するように、細胞内でタンパク質を高発現可能なプロモータ配列を持ち、その下流にタンパク質の開始コドンがあつて、その後にタンパク質を小胞体に送るためのシグナルタンパク質の配列と「粒子を形成する能力を有するタンパク質」の配列が連結されており、シグナルタンパク質配列と「粒子を形成する能力を有するタンパク質」配列の間、または「粒子を形成する能力を有するタンパク質」配列の内部、または下流に物質認識分子の配列が導入されている発現ベクターを作製し、それを細胞に形質転換して該中空ナノ粒子の発現誘導後、精製することによって作ることができる。

[0064] 酵母を用いた中空ナノ粒子の発現・精製を実施例1と2において例示する。ここで、中空ナノ粒子を作る細胞としては脂質2重膜、特に好ましくは小胞体を持つものであれば特に限定するものではなく、真核生物の細胞、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞、昆虫細胞などが好ましく、特に好ましくは酵母が用いられる。その理由は、酵母はハンドリングしやすく、組み替えが容易に行える上に、タンパク質の発現効率が良いなどの好ましい性質を有しているためである。

[0065] この中空ナノ粒子を用いた本発明に係る物質のセンシングツールは、センシングのターゲットとなる物質を含む試料を結合させるための「基板」と、基板上に結合した試料からセンシングのターゲット物質を特異的にセンシングし、かつ、センシングした信号を増幅するための、ターゲット物質を特異的に認識できる物質認識分子が結合されており、かつ、蛍光、または発光、または吸光、または放射線同位元素をその表面に提示、あるいは内包している「中空ナノ粒子」、そして中空粒子由来の蛍光、または

発光、または吸光、または放射線同位元素の量を検出できる「検出器」を組み合わせることで作製することができる。これらを用いたセンシングは、基板上に試料を結合させ、その上から中空ナノ粒子を反応させた後、センシングのターゲット物質と結合しなかつた中空ナノ粒子を洗い流した後に基板上に残った(つまり、センシングのターゲット物質と特異的に結合した)中空ナノ粒子の発する蛍光、または発光、または吸光、または放射線同位元素の量を検出器で検出することで成し遂げられる。ここで基板への試料の結合は試料を乾燥した粉の状態か、溶液中に懸濁、または溶解させて基板と反応させることで物理的な吸着を誘導する方法や基板を前もってセンシングのターゲット物質が特異的に結合するタンパク質やペプチド、核酸、糖鎖、脂質、金属、平面膜状生体認識分子整列体等で修飾しておき、センシングのターゲット物質を特異的に基板表面に結合させる方法がある。ここで基板とセンシングのターゲット物質、あるいはターゲット物質と中空ナノ粒子間の結合を促すために系を振動、または回転、または温度調節等が望ましいこともある。

- [0066] このセンシングツールの具体的な用途の一例としては、ある疾患の患者の血液中に特異的に存在するタンパク質に対する抗体や抗体の一部を基板上に結合させ、更に好ましくは平面膜状生体認識分子整列体を用いて整列させた状態で結合させ、患者の血液を基板に反応させることで、患者特有のタンパク質を基板上の抗体と結合・整列させた後、このタンパク質を特異的に認識する別の抗体が表面に結合されており、かつ、蛍光、または発光、または吸光、または放射線同位元素をその表面に提示、あるいは内包する中空ナノ粒子を用いて基板に結合した患者特有のタンパク質を認識させることで、該タンパク質の存在、あるいは含有量を中空ナノ粒子由來の蛍光、または発光、または吸光、または放射線同位元素量を測定することで確認・定量することが可能になる。この物質のセンシングツールを用いたセンシングは、微量信号の増幅効果のため、特に患者特有のタンパク質がnmol以下の極微量の場合その威力を發揮する。また、環境ホルモンの測定にも利用することができ、ダイオキシンを例に挙げると、哺乳類の体内におけるダイオキシンのレセプターである「AhR」タンパク質の全長あるいはダイオキシン結合部位のみをSPR用の金基板上に整列させた状態で結合させ、そこにダイオキシンの汚染が心配される土壌、河川水、母乳等か

ら組精製した、あるいはそのままの試料を基板と反応させ、基板をダイオキシンを含まない緩衝液で洗浄後、ダイオキシン-AhR結合体に特異的に結合する核内タンパク質である「ARNT」、またはダイオキシンに対する抗体が表面に結合されている中空ナノ粒子を基板に反応させ、その表面プラズモンの変化から試料中のダイオキシンの存在有無、あるいはその量を定量することが可能である。

[0067] 本発明の物質のセンシングツールを用いた環境ホルモンの測定はSPR以外にも、QCMを用いる方法や、蛍光、または発光、または吸光、または放射線同位元素をその表面に提示、または内包する中空ナノ粒子を用いたセンシングの方法等も考えられる。この際、環境中のダイオキシンの量は非常に微量であり、一般的には定量のためには試料からダイオキシンを抽出して更に高度に濃縮するといった前処理の必要があり、数日から数週間という長い時間が必要であったが、本発明のセンシングツールにおける信号の増幅効果により、前処理無しでも、あるいはより簡単な前処理によって測定が可能になり、測定の時間も数時間から数日と短くなることが期待される。

[0068] また、本発明のセンシングツールの別の用途の一例としては、センシングのターゲットであるタンパク質や核酸等を含む試料をSDS-PAGEやアガロースゲル等により電気泳動した後、PVDFやセルロース性の膜に電気的または浸透圧で転写し、転写した膜をターゲット物質を特異的に認識できる物質認識分子が結合されており、かつ、蛍光、発光、吸光、または放射線同位元素をその表面に提示、あるいは内包している中空ナノ粒子を含んだ緩衝液中で反応させて、中空ナノ粒子と膜上に転写されたターゲットタンパク質、あるいは核酸等とを結合させる。その後、結合していない中空ナノ粒子を中空ナノ粒子を含まない緩衝液で洗浄し、膜上に残った中空粒子由来の蛍光、発光、吸光、または放射線同位元素の量を検出するものもある。

[0069] 「粒子を形成する能力を有するタンパク質」からなる中空ナノ粒子としては、真核細胞でタンパク質を発現させることにより得られるものが挙げられる。つまり、真核細胞で「粒子を形成する能力を有するタンパク質」を発現させると、同タンパク質は、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積され、粒子として放出される。このとき、真核細胞としては、酵母や昆虫細胞等を適用できる。本発明において酵母や動物細胞、昆虫細胞には遺伝子組み替えを行った酵母や動物細胞、昆虫細胞も含まれる。酵

母を用いて中空ナノ粒子を形成する方法は、菌体内の可溶性タンパク質から高効率で粒子が生産される点で好適である。一方、昆虫細胞は、酵母よりも高等動物に近い真核細胞であるといえ、酵母で修飾されない糖鎖等の高次構造が可能である点で異種タンパク質の大量生産において好ましい方法といえる。

- [0070] 従来の昆虫細胞系はバキュロウイルスを用いた系であり、ウイルス粒子の発現を伴うためタンパク質発現に際して細胞が死滅、或いは溶解しやすい。その結果、死滅細胞から遊離したプロテアーゼにより発現させたタンパク質が分解されるという問題があった。また、タンパク質を分泌発現させる場合には、培地中に含まれる大量の牛胎仔血清が混入するため、培地中に分泌されても精製が困難なケースが多い。しかし最近、バキュロウイルスを介さない昆虫細胞系や無血清培養試薬がInvitrogen社により市販されている。したがって、このような材料を利用することにより、精製が容易となり、かつ高次構造、糖鎖修飾が維持されたタンパク質粒子を得ることができる。このような「粒子を形成する能力を有するタンパク質」としては、種々のウイルスから得られるサブウイルス粒子を適用することができる。具体的には、B型肝炎ウイルス(Hepatitis B Virus:HBV)やC型肝炎ウイルス(Hepatitis C Virus)、Micro virus、phage virus、adeno virus、hepasona virus、Parbo virus、papova virus、Retro viruses、Reo virus、Corona virus、カイコ細胞質多角体病ウイルス(*Bombyx mori cytoplasmic polyhedrosis virus*)などの表面抗原、または多角体タンパク質等が例示される。
- [0071] 発明者らは、後述の実施例に示すとおり、遺伝子組換え酵母で前記HBV表面抗原Lタンパク質を発現させることにより、発現されたHBV表面抗原Lタンパク質から酵母小胞体由来の脂質二重膜に多数の同タンパク質が埋め込まれた短径約20nm、長径約150nmの楕円状中空ナノ粒子が形成されることを見出し、報告している(J. Bio. Chem., Vol.267, No.3, 1953–1961, 1992)。このような粒子は、HBVゲノムや他のHBVタンパク質を全く含まないので、ウイルスとしては機能せず、人体への安全性は極めて高い。更に、酵母を用いて本中空ナノ粒子を生産することは人への病原性のリスクを伴う牛血清等の使用が不要のため、人体への安全性を更に高められる。
- [0072] この出願の発明の脂質を含む中空ナノ粒子では、以上のような種々の方法によつ

て得られた粒子表面の「粒子を形成する能力を有するタンパク質」を任意の物質認識分子に改変すること、または任意の物質認識分子を結合することで、種々の物質(核酸、タンパク質、ペプチド、および化合物等)を特異的に認識し、そのセンシング感度を著しく増幅することが可能となる。

- [0073] もちろん、「粒子を形成する能力を有するタンパク質」は、前記のB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質に限られるものではなく、粒子を形成することができるタンパク質であれば、どのようなものでもよい。例えば、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、ウイルス、ファージ、細菌類、菌類等に由来する天然タンパク質や遺伝子工学的に組み替えられたタンパク質、種々の合成タンパク質等が考慮されるが、好ましくは、ウイルス由来のタンパク質、更に好ましくは肝炎ウイルス由来のタンパク質、更に好ましくはB型肝炎ウイルス由来のタンパク質が用いられる。
- [0074] 「粒子を形成する能力を有するタンパク質」に結合される物質認識分子としては、例えば、細胞機能調節分子が挙げられる。本発明において「細胞機能調節分子」とは細胞が生きる上で必要とする様々な生命現象を司る因子を意味しており、例えば、抗体や抗体類似体、種々の抗体に対する抗原物質、抗体と結合するタンパク質、成長因子、サイトカイン、酵素、細胞表面や内部の種々のリガンド物質に対するレセプタータンパク質、生体ホルモンや環境ホルモン、シャペロンタンパク質、アミロイド形成タンパク質等が考えられる。実際に、物質認識分子として使われる際は、必ずしも例挙した上記分子の全長である必要は無くその一部や誘導体でも構わない。これら物質認識分子は、その組成として、タンパク質やペプチド、核酸、糖鎖、脂質等とその誘導体として、例えば、糖鎖やリン酸、化合物等によって修飾を受けたタンパク質やペプチド、あるいは核酸等が考えられる。同様に糖や脂質にタンパク質、ペプチド、核酸等が修飾されているものも考えられる。
- [0075] 本発明の「細胞機能調節分子」の取得方法としては、生細胞から種々の精製カラムを用いて精製する方法や遺伝子組み替えによって細胞機能調節分子を発現するプラスミドを作製し、大腸菌や酵母、昆虫、動物、植物等の細胞、または細胞を用いない無細胞タンパク質合成系を用いて生産し、精製する方法等が考えられる。遺伝子組み替え法を用いる際には精製を簡便にする目的にヒストグなどのタグ物質を細胞

機能調節分子に付加することも考えられる。タグを付加せずに簡単に細胞機能調節分子を発現・精製する方法としては、無細胞系のpuresystem(PGI社)を用いる方法もある。また、本発明の物質認識分子としての細胞機能調節分子がタンパク質では無い場合(例えば、核酸やステロイド物質等)は生体内から精製するか、化学合成によって作製することも可能である。

[0076] 本発明において「抗体類似体」とは、生体から作られる抗体以外で、抗原となる物質を特異的に認識できる生体由来または人工的な化合物を指し、例えば、抗体の抗原認識部位だけを遺伝子組み替えによって改変して得られる单鎖抗体(single chain antibody)やアフィボディー(affibody)、またはDNA結合タンパク質が特異的に認識するDNA配列を含む核酸分子や核酸のある配列を特異的に認識するタンパク質、またはアミロイドのような纖維構造体を特異的に認識できるタンパク質あるいは化合物等が挙げられる。これらは、ターゲットとする物質(タンパク質、核酸、化合物、細胞、あるいは組織等)に応じて適宜選択される。この抗体類似体の取得方法としては遺伝子組み替えによって抗体類似体を発現するプラスミドを作製し、大腸菌や酵母、昆虫、動物、植物等の細胞、または細胞を用いない無細胞タンパク質合成系を用いて生産し、精製する方法や抗体をタンパク質分解酵素等で切断し、その一部を精製して使う方法、また抗体類似体がタンパク質で無い場合は化学合成による合成や細胞からの抽出物等が考えられる。遺伝子組み替え法を用いる際には精製を簡便にする目的でヒストグなどタグ物質を抗体類似体に付加することも考えられる。タグを付加せずに簡単に抗体類似体を発現・精製する方法としては、無細胞系のpure system(PGI社)を用いる方法もある。もちろん本発明における「物質認識分子」は細胞機能調製分子に限るものではなく、センシングのターゲット物質と特異的に結合する能力を有するものであればその意を成すものである。

[0077] また、本粒子を作製する際には目的に応じて様々な応用が考えられる。例えば、中空ナノ粒子内に蛍光、または発光、または吸光、または放射線同位元素を発する物質をエレクトロポレーション、または超音波、または自然拡散法などの方法によって内包させることでセンシング信号の増幅も可能である。この際の「エレクトロポレーション」とは電気ショックによる物質の導入法であり、最良の条件は内包させる物質の性質

や濃度等によって異なるが、一般的には200mV～1000V程度の電圧を数m秒～数分間の処理で粒子に様々な物質を内包させることが可能である。超音波や自然拡散法による内包は中空ナノ粒子と内包させたい物質を水または緩衝液中に共存させ、攪拌させるか静置する、あるいは超音波処理を10～400ワットの強さで、10秒～2時間の間処理することで成し遂げられる。また、「粒子を形成する能力を有するタンパク質」の一部に目的の物質認識分子以外にも本粒子の精製のためのタグタンパク質やセンシングを容易にする目的で蛍光、発光、吸光、または放射線同位元素を発する物質、更には種々のセンシング基板(SPR、QCMなどを用いて物質を特異的にセンシングするときの基板)に固定させるための物質等を化学修飾法、または遺伝子工学的手法により一つの中空ナノ粒子に複数の分子を同時に結合することが可能である。この粒子表面(粒子の外または内側)への複数分子の結合は一つの発現ベクターではなく、それぞれ異なる分子を「粒子を形成する能力を有するタンパク質」に結合した複数の発現ベクターを同時に一つの細胞で発現させることによつても成し遂げられる。タンパク質を表層に提示させる技術は既にファージディスプレー法や酵母の表層にタンパク質を提示する方法、抗体などをポリマーや金属製粒子の表面に結合させる方法(Szardenings M, J. Recept Signal Transduct Res., 23, 307–349, 2003; 植田充美、バイオサイエンスとインダストリー、55、253–254、1997; 植田充美、村井稔幸、生物工学、76、506–510、1998)などが知られているが、安全性や粒子サイズまたは作製の容易さなどに問題があり、センシング系としての利用には制限がある。本出願のナノ粒子は精製されたタンパク質粒子であるため感染性がなく、溶媒などの環境の変化に強い。また、取扱いの点から、その直径は20～500nmが好ましく、50～200nmがより好ましい。更に、その応用としてシリコンなどの基板上への展開により発明者らの論文Anal. Biochem., Vol. 309, 196–119, 2002に示すように本発明のナノ粒子は平面膜構造になるため、粒子の表面に結合されたタンパク質を脂質2重膜を介して基板上に整列化した「平面膜状生体認識分子整列体」を形成できる。同時に、この「平面膜状生体認識分子整列体」は脂質2重膜を基板上で被覆することになり、目的以外のタンパク質等の基板への非特異的な吸着を防止する効果も期待できる。

[0078] このように本発明の中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツールは、粒子の表面に結合されたタンパク質の方向性を整列させる、あるいは、非特異的吸着を防止する目的で、中空ナノ粒子を基板上に展開して物質をセンシングさせることも可能である。更に本発明の中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツールは、ELISA法でよく見られるサンドイッチ方式のセンシングツールとして、平面膜状生体認識分子整列体にセンシングのターゲットとなる物質を結合させた後、その上から更に別の中空ナノ粒子を用いてターゲット物質をセンシングすることで、基板への非特異的吸着を抑えながらターゲット物質のセンシング感度を向上させるといった応用も考えられる。このように本発明の中空ナノ粒子を用いた物質のセンシングツールは様々な応用により、従来の物質センシングツールでは得られなかつた感度と特異性を得ることが可能になる。

[0079] 以上述べたように、この出願の発明の脂質とタンパク質を含み、中空構造であることと特徴とするナノ粒子を使った物質のセンシングツールおよびそれを用いたセンシング方法は、該粒子が物理的に非常に安定で、粒子の表面に脂質膜成分を含むことで流動性が生まれ、また物質の非特異的吸着を抑えることが可能である。しかも、細菌やウイルス等の表面にタンパクを提示する方法と比較し安全、かつ直径100nm前後の粒子であるため、SPR等の既存の物質センシング方法への応用も容易であり、微量のセンシング信号を効率的に増幅できることをその特徴とする。更に、該ツールを用いることで、極微量に存在する分子をセンシングするときの信号を効率的に増幅することが可能となるため、プロテインチップ、医療における診断マーカーのセンシング・評価、環境物質測定、生化学の物質測定・分析等、生体や環境中の微量成分を簡易的、あるいは高感度でセンシングすることを目的とした様々な分野への応用が可能となる。

実施例

[0080] 以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態について更に詳しく説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

以下の実施例においては、本発明のセンシングツールとして実施例1と3の金基板

に結合させる中空ナノ粒子と金の基板を組み合わせたSPR装置や実施例2の抗ヒスチジンタグが付いた96well plateとGFP融合粒子そして蛍光プレートリーダーを組み合わせた蛍光中空ナノ粒子の測定装置を使用している。

[0081] 以下の実施例において、HBsAgとは、B型肝炎ウイルス表面抗原(Hepatitis B virus surface Antigen)を示す。HBsAgは、HBVの外被タンパク質であり、図1の模式図のように、HBsAgには、Sタンパク質、Mタンパク質、Lタンパク質の3種類がある。このうち、Sたんぱく質は、3種のタンパク質に共通した、重要な外被タンパク質であり、Mタンパク質は、Sタンパク質のN末端側に55アミノ酸(pre-S2 peptide)が付加したものである。また、Lタンパク質は、Mタンパク質のN末端側に、108もしくは119アミノ酸(pre-S1 peptide)が付加したものである。HBsAg Lタンパク質のPre-S領域(pre-S1, pre-S2)は、HBVが肝細胞に結合する際に、それぞれ重要な役割を担うことが知られている。Pre-S1は、肝細胞に直接結合する部位を持ち、pre-S2は、血中の重合アルブミンを介して肝細胞に結合する重合アルブミンレセプターを有するものである。真核細胞でHBsAgを発現させると、同タンパク質は、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積される。HBsAgのLタンパク質は、分子間で凝集を起こし、小胞体膜を取り込みながら、出芽様式でルーメン側に粒子として放出される。以下の実施例では、HBsAgのLタンパク質とその改変体を用いた。図2に以下の実施例に記載されるHBsAg粒子の発現および精製操作の概略説明図を示した。

[0082] [実施例1]

1. 遺伝子組換え酵母によるHBsAg粒子の発現

発明者らによって報告されたJ. Bio. Chem., Vol. 267, No. 3, 1953–1961, 1992記載の方法に基づいて、pGLDLIIP39-RcTを保持した遺伝子組換え酵母(Saccharomyces Cerevisiae AH22R-株)を、合成培地High-Piおよび8S5 N-p400中で培養し、HBsAgLタンパク質粒子を発現させた。(図2a, b) 定常成長期(約72時間後)にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent(Pierce Chemical Co. 製)を用いて、whole cell extractを準備し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリラミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を用いて分離して、

銀染色とHBsタンパク質に対する抗体を用いたwestern blotting(1次抗体は、anti-HBsAgモノクローナル抗体)によって試料中のHBsAgタンパク質の同定を行なった。

[0083] 2. HBsAg粒子の遺伝子組換え酵母からの精製

(1)合成培地8S5N-P400で培養された遺伝子組換え酵母(湿重量26g)をbuffer A溶液(7.5M 尿素、0.1M リン酸ナトリウム、pH7.2、15mM EDTA、2mM PMSF、0.1% Tween80)100mlに懸濁し、ガラスビーズを用いてビードビーター(BEAD-BEATER)にて酵母を破碎した。破碎後、上清を遠心分離により回収した。(図2c、d)

(2)次に、上清を0.75倍容の33%(w/w)PEG6000と混合し、30分間氷冷した。その後、遠心分離(7000rpm、30分間)を行い、ペレットを回収した。同ペレットは、Tween80を含まないbuffer A溶液中で再懸濁した。

[0084] (3)再懸濁した液を、10~40%の勾配をかけたCsClに重層し、28,000rpm、16時間の超遠心分離を行なった。遠心分離後の試料を12画分に分け、ウェスタンプロット法(Western Blotting)によりHBsAgを含む画分を同定した。更に、HBsAgを含む画分をTween80を含まないbuffer A溶液で透析した。

[0085] (4) (3)で得られた透析液(12ml)を5~50%の勾配をかけたショ糖に重層し、28,000rpm、16時間の超遠心分離を行なった。遠心分離後、(3)と同様に、HBsAgを含む画分を同定し、HBsAgを含む画分を尿素とTween80は含まず、代わりに0.85%のNaClを含むbuffer A溶液で透析した((2)~(4):図2e)。

[0086] (5) (4)と同様の操作を繰り返し、透析後の試料をウルトラフィルター(Ultra Filter)Q2000(アドバンテック社製)を用いて濃縮し、使用する時まで4°Cにて冷蔵保存した(図2f)。CsCl平衡遠心分離後のウェスタンプロット(3)の結果から、HBsAgは、分子量52kDaでS抗原性を有するタンパク質であることを確認した。最終的に、培地2.5L由来、湿重量26gの菌体から、約24mgの精製HBsAg粒子を得た。一連の精製過程における画分を銀染色SDS-PAGEで解析した。また、精製により酵母由來のプロテアーゼが除去されていることを確認するために、(5)で得られたHBsAg粒子を37°Cで12時間インキュベートした後、SDS-PAGEを行い、銀染色により同定を

行なった。その結果、酵母由来のプロテアーゼは、一連の精製過程において完全に除去されていることが確認された。

[0087] 3. ナノ粒子による表面プラズモン信号増幅

全てのSPR操作は25°Cで行った。上記の要領で酵母から精製したHBsAg粒子を50mg/ml濃度で日本レーザ電子社のNanosensor用SPR測定チップ上に吸着させた。コントロールとして、牛血清アルブミン(BSA)タンパク質を同要領でチップ上に吸着させ、両タンパク質がSPRの金基板に結合した際の信号変化を計測した。その結果、図3で示すようにBSAに比べて、HBsAg粒子のSPR信号は6倍以上であることが確認された。同要領でGFP、IgGなど種々のタンパク質とのSPR信号を比較した結果、HBsAg粒子がSPR基板上に結合することで上記のタンパク質よりSPRの信号が5～10倍以上増幅されることが確認された。これにより、本発明における粒子を使って物質センシングする方法はそのセンシング感度を劇的に向上可能であることが確認された。

[0088] [実施例2]

1. 遺伝子組換えによる物質認識タンパク質を融合したHBsAgL粒子の発現ベクター作製

先ず、発明者らによって報告された特許公開2001-316298で記すように著者らの報告J. Bio. Chem., Vol. 267, No. 3, 1953-1961, 1992記載の方法に基づいて作製されたpGLDLIIP39-RcTを改変して、本実施例における「物質認識タンパク質を融合したHBsAgL粒子の発現ベクター」である「pGLDLIIP39-RcT-GFP」を作製した。以下にその作成方法を簡単に説明する。先ず、配列番号1と2のプライマーを用いて上記pGLDLIIP39-RcT上に存在するHBsAgのLタンパク質配列の一部(3～77コーディング部位)を制限酵素NotIサイト(gcgccgc)の配列に置換したpGLDLIIP39-RcT nullを作製した。該置換は、QuikChange(登録商標) Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene社)を用いて該キットに添付のプロトコールに従って行っており、配列番号1と2のプライマーは上記置換を行ったため、該キットに添付のプロトコールに従って設計した相補的配列のプライマーである。次に、配列番号3と4のプライマーを用いてPCRを行うことで、GFP遺伝子の増幅

を行った。配列番号3のプライマーは、5'末端に制限酵素NotIサイトの配列を持ち、その下流に6個の連続したヒスチジン残基をコードする配列とGFP遺伝子の5'末端29塩基を認識する配列が続いている。また、配列番号4のプライマーはその5'末端に制限酵素NotIサイトの配列を持ち、その下流にGFP遺伝子の3'末端20塩基を認識する配列が続いている。この配列番号3と4のプライマーにより増幅したPCR産物を制限酵素NotIで処理し、同じくNotIで切断した上記作製のベクターpGLDLIIP39-RcT nullに挿入・連結することで、N-末にヒスチジンタグを持つGFPをpGLDLIIP39-RcT nullに挿入したベクター、pGLDLIIP39-RcT-GFPを作製した(図4)。

- [0089] 2. 遺伝子組換え酵母による物質認識用タンパク質を融合したHBsAgL粒子の発現
上記の酵母発現ベクターpGLDLIIP39-RcT-GFPを保持した遺伝子組換え酵母(*Saccharomyces Cerevisiae* AH22R-株)を、合成培地High-Piおよび8S5 N-P400中で培養し、物質認識用タンパク質を融合したHBsAgLのタンパク質粒子を発現させた。(図2a、b) 定常成長期(約72時間後)にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent(Pierce Chemical Co. 製)を用いて、whole cell extractを準備し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリラミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を用いて分離して、銀染色とヒスチジンタグに対する抗体を用いたwestern blottingによって試料中のHBsAgLタンパク質に融合した物質認識用タンパク質の同定を行なった。pGLDLIIP39-RcT-GFPの酵母AH22R株への形質転換は発明者らによって報告された特許公開2001-316298で記す方法に従った。これより、物質認識用タンパク質融合(GFPの融合)HBsAgLタンパク質の分子量が72kDaのタンパク質であることが明らかとなった。
- [0090] 3. HBsAg粒子の遺伝子組換え酵母からの精製
(1) 1Lの合成培地8S5N-P400で培養された遺伝子組換え酵母(湿重量10g)をbuffer A溶液(0.1Mリン酸ナトリウム、pH7.2、15mM EDTA、2mM PMSF、0.1% Tween80)100mlに懸濁し、平均直径0.5mmのガラスビーズを用いてビードビーター(BEAD-BEATER)にて酵母を破碎した。破碎後、上清を遠心分離により回収した(図2c、d)。

- [0091] (2) 次に、上清をAmersham社のHisTrapカラム(1ml)を用いて同社のタンパク質精製装置(ACTA prime)にてヒスチジンとニッケル(Ni²⁺)間のアフィニティーによる精製を行った。精製は60mMのイミダゾールが入ったPBS(－)(第一製薬)緩衝液中でヒスチジンタグをニッケルカラムに結合させ、同緩衝液20mlで洗浄後、500mMイミダゾールを含むPBS(－)緩衝液でニッケルに結合した粒子を抽出した。抽出したタンパク質は銀染色とヒスチジンタグ抗体を用いたwestern blottingによって精製度を確認した。
- [0092] (3) 次に、分子量分画100kDaの限外濾過膜(Ultra Filter; Q2000(アドバンテック社製))を用いて脱塩、濃縮し、使用する時まで4℃にて冷蔵保存した。
- [0093] (4) GFPが融合したHBsAgの精製粒子は510nmの波長で強い緑色蛍光を発することを蛍光顕微鏡(Olympus社、BX51)にて確認した。(5) 上記一連の精製操作により最終的に、培地1L由来、湿重量10gの菌体から、約2mgの精製粒子を得た。
- [0094] 4. GFP融合粒子による抗ヒスチジンタグ抗体のセンシング
96well plateに濃度を振ったセンシングの目的物質である抗ヒスチジンタグ抗体(ナカライテスク、anti-His6 monoclonal)を4℃で16時間反応(結合)させた後、0.5%の牛血清アルブミンによって室温、1時間のブロッキングを行った。次に、上記実施例1の要領で酵母から精製したGFP融合粒子200ml(50mg/ml濃度)を加え、室温で反応させ、未反応の粒子はPBSで3回洗浄した後、蛍光プレートリーダ(Molecular device社、Spectra Max Gemini EM)でextension 484nm、emission 510nmで抗ヒスチジンタグ抗体に結合したGFPの蛍光を測定した。コントロールとして大腸菌から精製したヒスチジンタグを持つGFPタンパク質のみを同条件で測定した。その結果、コントロールのGFPのみを使った場合に比べてGFP融合粒子は抗ヒスチジンタグ抗体に非常に高感度に結合し、100倍以上高感度にセンシングできることが確認された。(表1)

[表1]

抗ヒスチジンタグ 抗体濃度(μ g/ml)	0	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	200
GFP 融合粒子	12	37	65	111	217	447	702	966	1,329
His-tagged GFP	12	14	14	15	16	22	29	39	51

[0095] [実施例3]

SPR法によるヒスチジンタグのセンシング

上記実施例2の抗ヒスチジンタグ抗体50mg/ml濃度を結合させたSPR測定チップを日本レーザ電子社のNanosensorに装着した後、上記実施例1の要領で酵母から精製したGFP融合粒子とコントロールのヒスチジンタグを持つGFPタンパク質を同時に流してニッケル基板上のヒスチジンタグのセンシング感度を測定した。結果は図5に示すように、同量の抗ヒスチジンタグ抗体に対するSPRによるヒスチジンタグのセンシング感度は、コントロールに比べて大幅に向上されることが確認された。なお、この結果は抗ヒスチジンタグ抗体の代わりにアミノカップリング法によってSPRセンサー上に結合させたニッケル錯体を使って行っても同様の結果が得られることが確認された。

[0096] [実施例4]

SPRによる抗ヒスチジンタグ抗体のセンシング

上記実施例2のヒスチジンタグを有するGFP融合粒子を1mg/ml濃度で日本レーザ電子社のNanosensor用SPR測定チップ上に結合させ、GFP融合粒子による平面膜状生体認識分子整列体を形成させた。未反応のGFP融合粒子をPBSで洗浄した後、2mg/ml濃度のBSAを測定チップ上に加えて10分間反応させ、PBSで洗浄することで、平面膜状生体認識分子整列体へのBSAの非特異的結合を調べた。その後、抗ヒスチジンタグ抗体を200 μ g/ml濃度で測定チップ上に加えて10分間反応させた。平面膜状生体認識分子整列体を形成しないコントロールとして、大腸菌から精製したヒスチジンタグを持つGFPタンパク質を1mg/ml濃度でSPR測定チップ

に結合させて同様の実験を行った。その結果を図6に示す。

[0097] 大腸菌から精製したヒスチジンタグを持つGFPタンパク質をSPR測定チップに結合させた場合はBSAの非特異的結合が観察されているのに対し、GFP融合粒子をSPR測定チップに結合させた平面膜状生体認識分子整列体では、BSAの非特異的結合は見られなかった。その後、抗ヒスチジンタグ抗体を平面膜状生体認識分子整列体に加えた時は抗原－抗体反応による特異的な結合により安定した信号が観察された。これによって、本発明の中空ナノ粒子による平面膜状生体認識分子整列体は非特異的結合を抑え、且つ物質認識分子が整列しており、高感度センシングに適していることが明らかになった。

[0098] 本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

産業上の利用の可能性

[0099] 本発明により、物質認識分子を提示した中空ナノ粒子を利用した、生体または環境中の極微量成分を効率的にセンシングするための汎用的なツールおよびセンシング方法が提供される。本発明のセンシングツールおよびセンシング方法は、プロテインチップ、医療分野における診断マーカーのセンシング・評価、環境物質測定、生化学の物質測定・分析など、極微量成分のセンシングを必要とする様々な分野に応用できる。

配列表フリーテキスト

[0100] 配列番号1－人工配列の説明:QuikChange(登録商標) Site-Directed Mutagenesis KitによるpGLDIIP39-RcTへの部位特異的変異導入用プライマー
配列番号2－人工配列の説明:QuikChange(登録商標) Site-Directed Mutagenesis KitによるpGLDIIP39-RcTへの部位特異的変異導入用プライマー
配列番号3－人工配列の説明:6個の連続したヒスチジンコドン配列を含むPCRによるGFP遺伝子の増幅用プライマー
配列番号4－人工配列の説明:PCRによるGFP遺伝子の増幅用プライマー

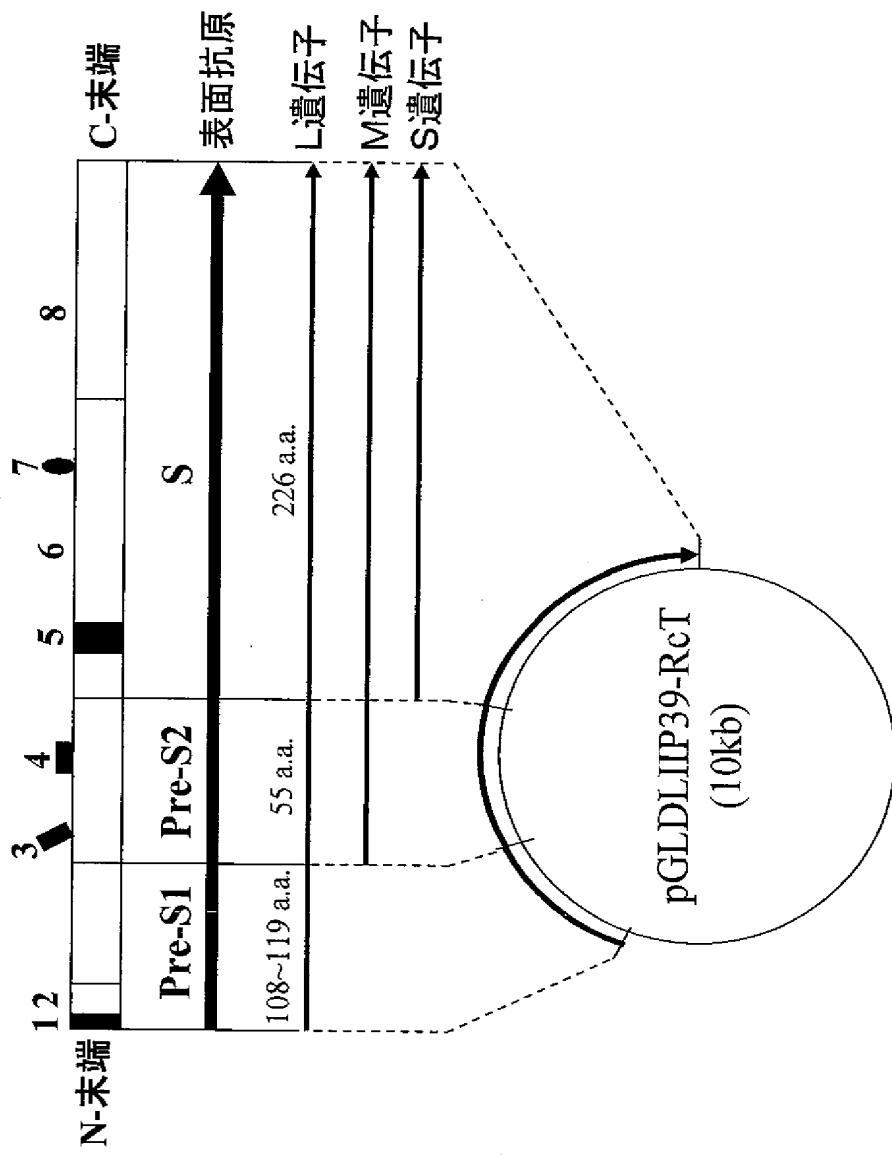
請求の範囲

- [1] 脂質2重膜を取り込んでナノサイズの粒子を形成する能力を有するタンパク質に物質認識分子が結合したセンシングツール。
- [2] 結合が共有結合である請求項1に記載のセンシングツール。
- [3] ナノサイズの粒子が中空ナノ粒子である請求項1に記載のセンシングツール。
- [4] タンパク質がウイルスの表面抗原タンパク質である請求項1に記載のセンシングツール。
- [5] タンパク質がB型肝炎ウイルスの表面抗原タンパク質である請求項1に記載のセンシングツール。
- [6] タンパク質が真核細胞由来の脂質2重膜を取り込んでナノサイズの粒子を形成する能力を有するタンパク質である請求項1に記載のセンシングツール。
- [7] タンパク質が酵母由来の脂質2重膜を取り込んでナノサイズの粒子を形成する能力を有するタンパク質である請求項1に記載のセンシングツール。
- [8] タンパク質が動物または昆虫細胞由来の脂質2重膜を取り込んでナノサイズの粒子を形成する能力を有するタンパク質である請求項1に記載のセンシングツール。
- [9] 物質認識分子が細胞機能調節分子である請求項1に記載のセンシングツール。
- [10] 物質認識分子が抗原、抗体、抗体の一部、または抗体類似体である請求項1に記載のセンシングツール。
- [11] 物質認識分子がリガンド物質と結合する細胞表面あるいは細胞内のレセプタータンパク質、その変異体、その一部、またはそれに結合する物質である請求項1に記載のセンシングツール。
- [12] 物質認識分子が酵素、その変異体、その一部、またはそれに結合する物質である請求項1に記載のセンシングツール。
- [13] 蛍光分子、発光分子、吸光分子および放射線同位元素を持つ分子からなる群より選択された1種以上の分子を物質認識分子に結合させた請求項1に記載のセンシングツール。
- [14] 蛍光分子、発光分子、吸光分子および放射線同位元素を持つ分子からなる群より選択された1種以上の分子を粒子を形成する能力を有するタンパク質に結合させた

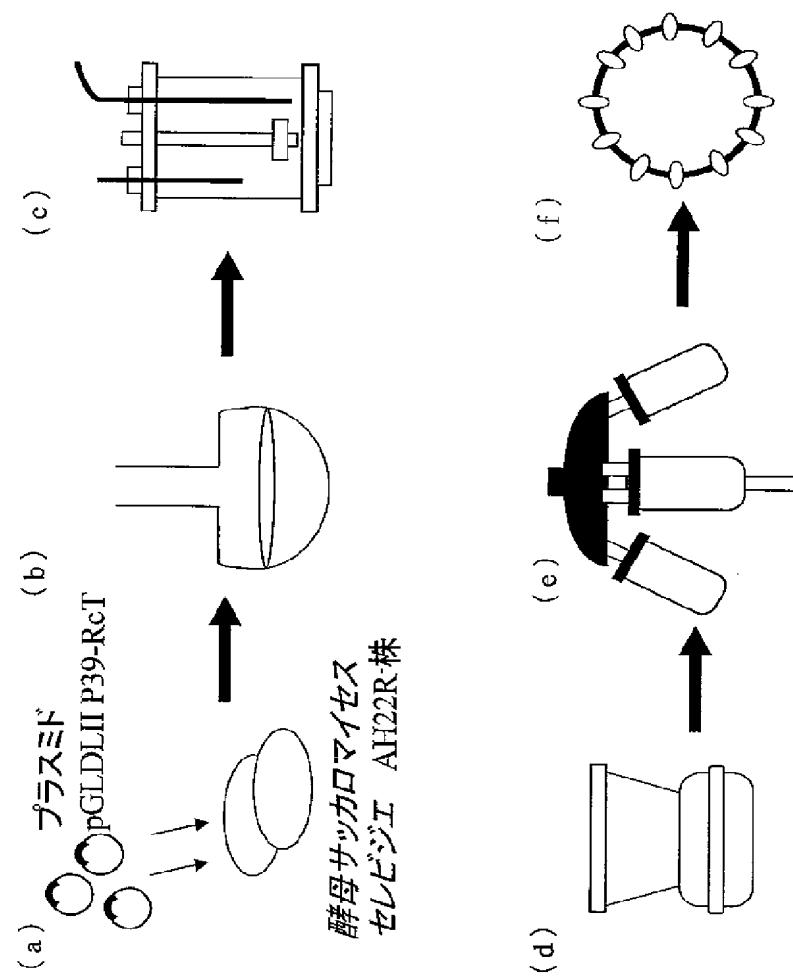
請求項1に記載のセンシングツール。

- [15] 萤光分子、発光分子、吸光分子および放射線同位元素を持つ分子からなる群より選択された1種以上の分子を脂質2重膜に結合させた請求項1に記載のセンシングツール。
- [16] 萤光分子、発光分子、吸光分子および放射線同位元素を持つ分子からなる群より選択された1種以上の分子を中空ナノ粒子に内包させた請求項1に記載のセンシングツール。
- [17] ナノサイズの粒子が基板上に並ぶことで形成される平面膜状生体認識分子整列体を用いる請求項1に記載のセンシングツール。
- [18] 請求項1に記載のセンシングツールを用いる物質のセンシング方法。

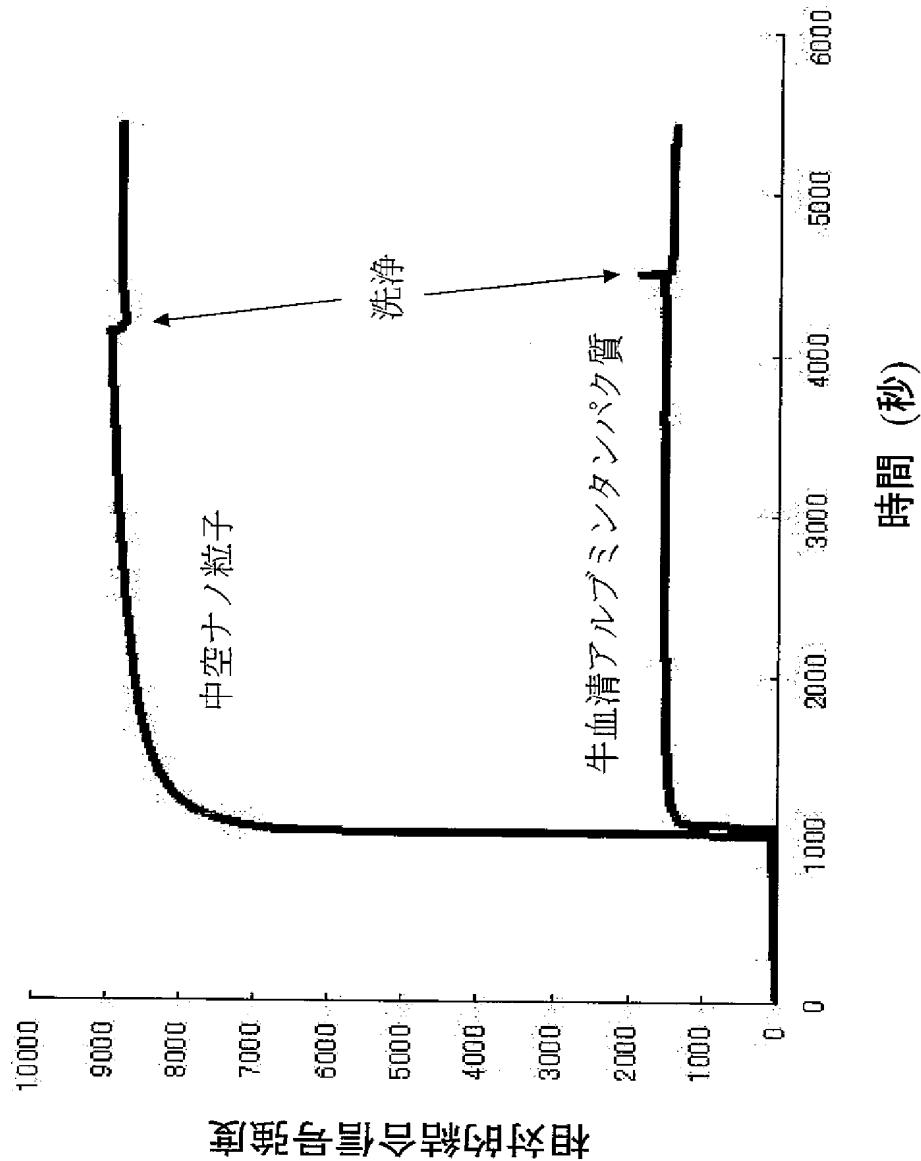
[図1]



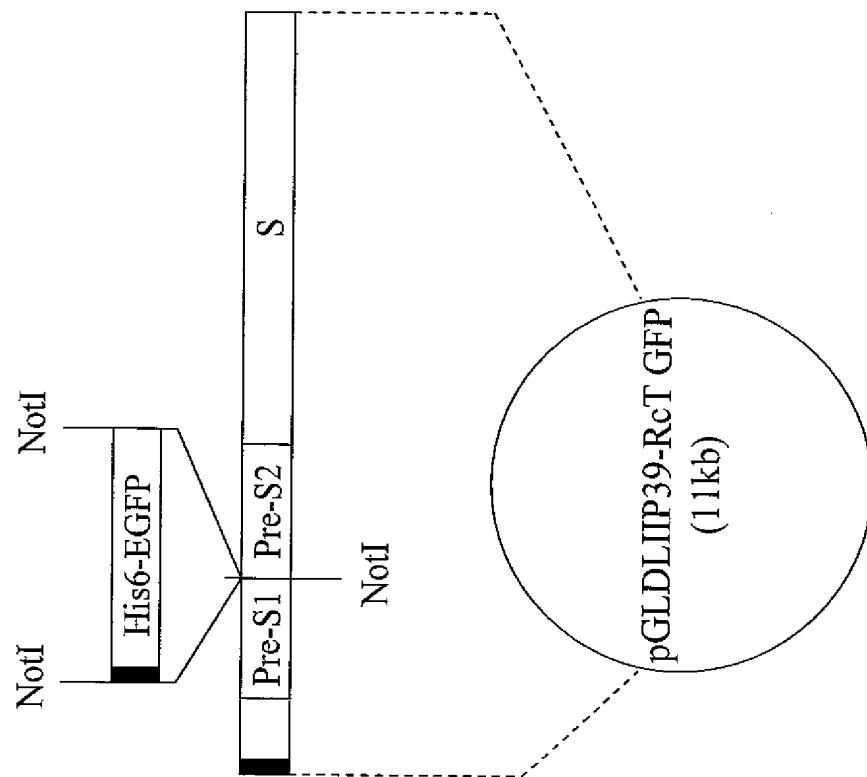
[図2]



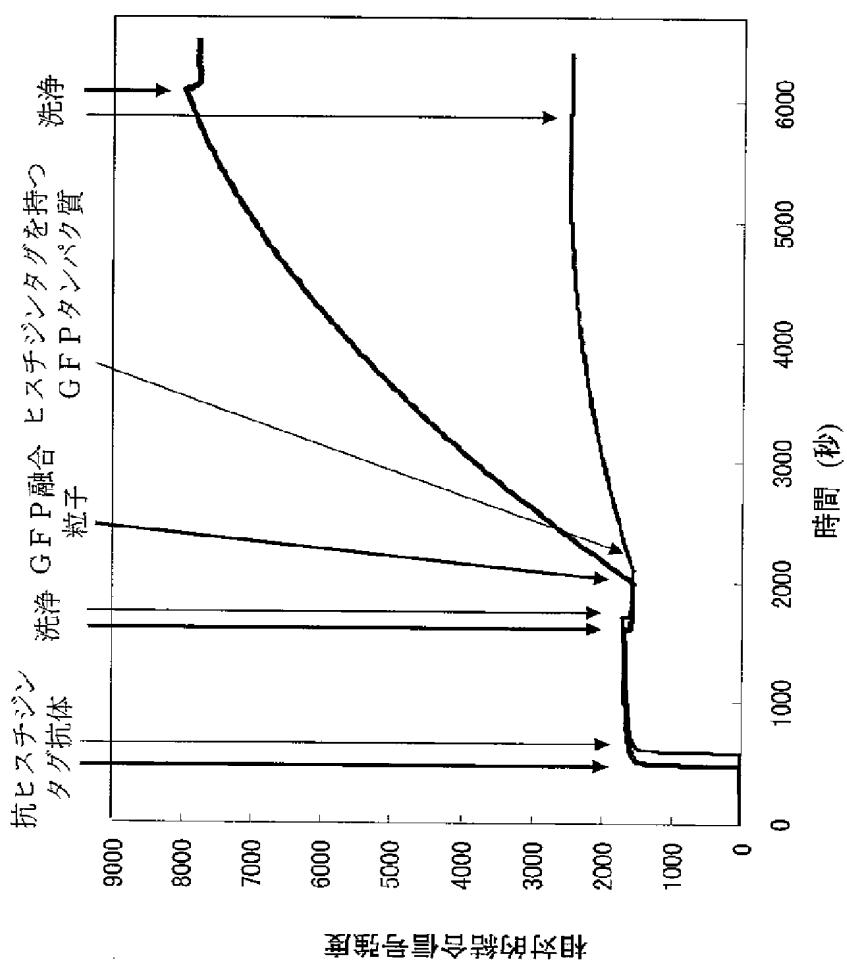
[図3]



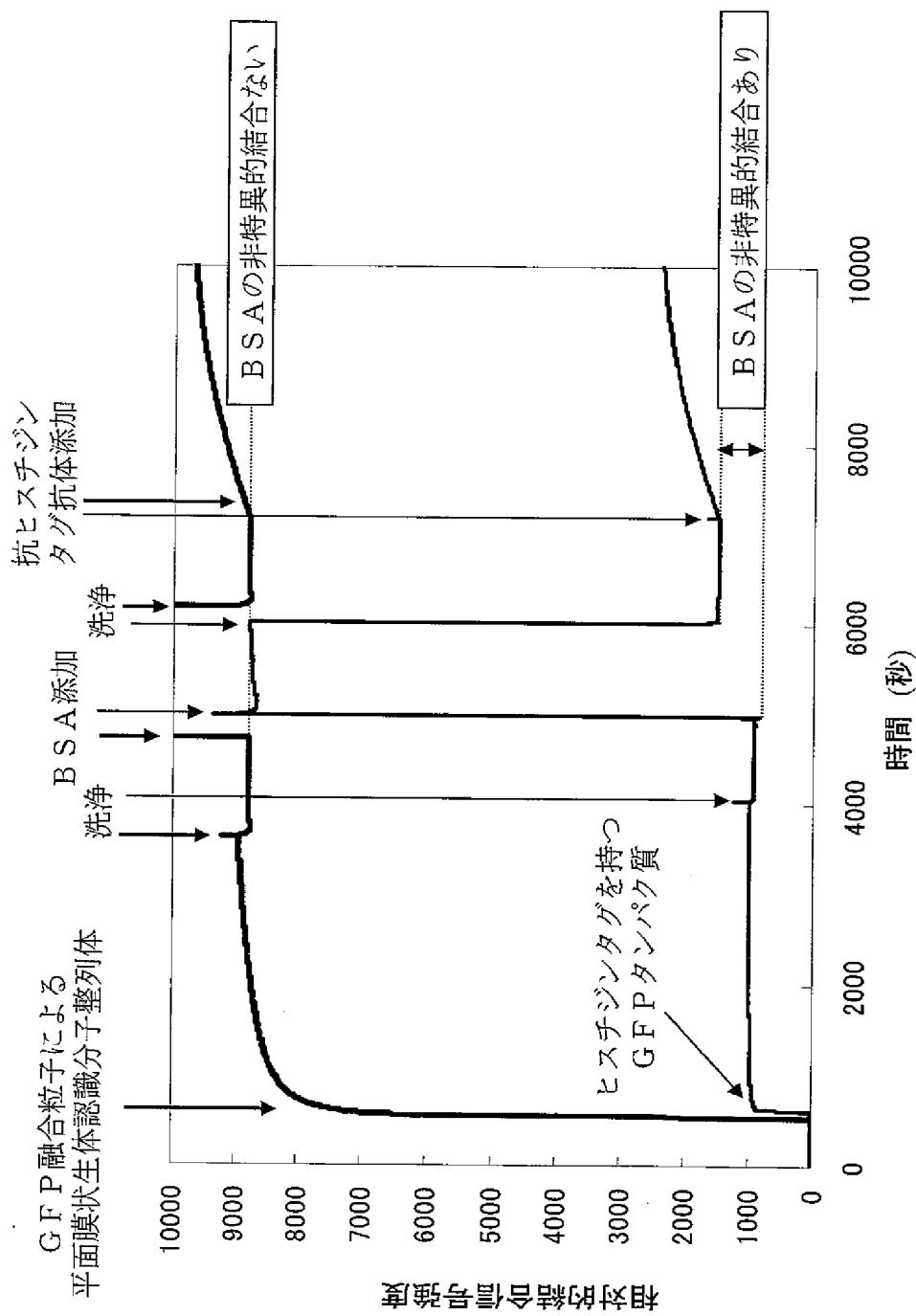
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005803

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N33/544, 33/576

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G01N33/544, 33/576Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2003-501631 A (Zeptosens AG.), 14 January, 2003 (14.01.03), & WO 2000/073798 A & AU 200053950 A & EP 1180242 A	1-3, 9-18 4-8
Y	JP 2001-316298 A (Japan Science and Technology Corp.), 13 November, 2001 (13.11.01), & WO 2001/064930 A & EP 1262555 A & KR 2002092971 A & US 2003/0092069 A	4-8

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
26 April, 2005 (26.04.05)Date of mailing of the international search report
17 May, 2005 (17.05.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl.⁷ G01N33/544, 33/576

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl.⁷ G01N33/544, 33/576

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2003-501631 A (ツエプトゼンス アクチエンゲゼルシャフト)	1-3, 9-18
Y	2003.01.14 & WO 2000/073798 A & AU 200053950 A & EP 1180242 A	4-8
Y	JP 2001-316298 A (科学技術振興事業団) 2001.11.13 & WO 2001/064930 A & EP 1262555 A & KR 2002092971 A & US 2003/0092069 A	4-8

【 C 欄の続きにも文献が列挙されている。】

【 パテントファミリーに関する別紙を参照。】

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.04.2005

国際調査報告の発送日

17.05.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

宮澤 浩

2 J 9407

電話番号 03-3581-1101 内線 3252